

01-06-04

PTO/SB/21 (08-00)

Approved for use through 10/31/2002. OMB 0651-0031

U.S. Patent and Trademark Office: U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

**TRANSMITTAL  
FORM**

(to be used for all correspondence after initial filing)

Application Number	10/678,706
Filing Date	October 2, 2003
First Named Inventor	Marie-Christine Seguin
Group Art Unit	
Examiner Name	Not Yet Assigned
Attorney Docket Number	8830-239US1

Total Number of Pages in This Submission 21

**ENCLOSURES (check all that apply)**

- |   |   |   |
|---|---|---|
| <input type="checkbox"/> Fee Transmittal Form<br><input type="checkbox"/> Fee Attached<br><input type="checkbox"/> Amendment / Reply<br><input type="checkbox"/> After Final<br><input type="checkbox"/> Affidavits/declaration(s)<br><input type="checkbox"/> Extension of Time Request<br><input type="checkbox"/> Express Abandonment Request<br><input type="checkbox"/> Information Disclosure Statement<br><input checked="" type="checkbox"/> Certified Copy of Priority Document(s)<br><input type="checkbox"/> Response to Missing Parts/ Incomplete Application<br><input type="checkbox"/> Response to Missing Parts under 37 CFR 1.52 or 1.53 | <input type="checkbox"/> Assignment Papers (for an Application)<br><input type="checkbox"/> Drawing(s)<br><input type="checkbox"/> Licensing-related Papers<br><input type="checkbox"/> Petition<br><input type="checkbox"/> Petition to Convert to a Provisional Application<br><input type="checkbox"/> Power of Attorney, Revocation Change of Correspondence Address<br><input type="checkbox"/> Terminal Disclaimer<br><input type="checkbox"/> Request for Refund<br><input type="checkbox"/> CD, Number of CD(s) _____ | <input type="checkbox"/> After Allowance Communication to Group<br><input type="checkbox"/> Appeal Communication to Board of Appeals and Interferences<br><input type="checkbox"/> Appeal Communication to Group (Appeal Notice, Brief, Reply Brief)<br><input type="checkbox"/> Proprietary Information<br><input type="checkbox"/> Status Letter<br><input checked="" type="checkbox"/> Other Enclosure(s) (please identify below):<br>Return Postcard. |
|---|---|---|

Remarks

**SIGNATURE OF APPLICANT, ATTORNEY, OR AGENT**

Firm or Individual name	Daniel A. Monaco Drinker Biddle & Reath LLP
Signature	
Date	January 5, 2004

**CERTIFICATE OF MAILING**

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as Express mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 on this date:

January 5, 2004

Typed or printed name Denise M. Collins

Signature

Date

January 5, 2004

Burden Hour Statement: This form is estimated to take 0.2 hours to complete. Time will vary depending upon the needs of the individual case. Any comments on the amount of time you are required to complete this form should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, Washington, DC 20231. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Assistant Commissioner for Patents, Washington, DC 20231.

**PRINCIPALTE DE MONACO**

**MINISTRE D'ETAT**

**DIRECTION DE L'EXPANSION ECONOMIQUE  
DIVISION DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE**

# **COPIE OFFICIELLE**

**D'UN BREVET DELIVRE SANS GARANTIE DU GOUVERNEMENT EN DATE DU  
28/05/2003 SOUS LE N° 200060**

*Demande déposée 04/10/2002 (10 H 45) sous le PV n° 2488*

**par :** S.A.M. EXSYMOL  
4, Avenue Prince Héritaire Albert  
98000 (PRINCIPALTE DE MONACO)

**pour :** "Produit de couplage entre la tryptamine et un alpha-aminoacide,  
son procédé de préparation et son application dans le domaine de la neuro-  
cosmétique"

**De la protection :** 20 années à compter du dépôt sous réserve  
du paiement d'un droit annuel ou annuité  
(Art. 4 de la loi n° 606 du 20 juin 1955 modifiée)



DUPLICATA

# 10 45

200060

5

10

15

**BREVET D'INVENTION**

TITRE DE L'INVENTION :

**PRODUIT DE COUPLAGE ENTRE LA TRYPTAMINE ET UN  
ALPHA-AMINOACIDE, SON PROCÉDE DE PREPARATION ET SON  
APPLICATION DANS LE DOMAINE DE LA NEURO-COSMETIQUE  
DEPOSANT :  
EXSYMOL S.A.M.**

25

30

La présente invention a pour objet une famille de pseudodipeptides, produits de couplage entre la tryptamine, amine primaire de nature indolique, et une sélection d'alpha-aminoacides.

L'objet de l'invention concerne également le procédé de préparation desdits produits, ainsi que leurs applications en tant que substances actives sur le système nerveux cutané.

Les interactions entre système nerveux et cellules cutanées, tant sur les plans anatomique que fonctionnel, sont nombreuses et désormais bien établies. Cette récente compréhension a d'ailleurs ouvert la porte à divers champs d'activité, en particulier en cosmétique, qualifiée de "neuro-cosmétique" pour traduire toute action qui vise à agir sur de telles interactions, et en conséquence, à remédier à toute altération ou "désordre" cosmétique cutané inhérent.

La peau est en effet un organe particulièrement innervé, avec une innervation dense et fine dans les couches dermiques, mais également jusqu'aux couches les plus superficielles situées dans l'épiderme, à l'exception de la couche cornée. Cette innervation est notamment à la base de tout notre système sensoriel, tel les sensations de toucher, douleur, démangeaison, température, pression, etc... .

Les connexions entre nerfs et peau sont ainsi très étroites, caractérisées par, outre des contacts physiques, un échange d'informations permanent entre les cellules nerveuses et les cellules cutanées. Les mécanismes, à l'origine de cette communication dite "neurogénique", sont désormais connus. Ces échanges sont le fruit, tout d'abord, de substances biologiquement actives que sont les neuromédiateurs (Lotti T. et al., J. Am. Acad. Dermatol. (1995), vol.33, pp.482-496). La plupart de ces vecteurs chimiques de l'information nerveuse retrouvés dans le derme et l'épiderme sont de nature peptidique : substance P, neuropeptide Y, calcitonin gene-related peptide ou CGRP, etc... . Mais d'autres appartiennent au groupe des catécholamines avec notamment l'adrénaline et l'acétylcholine. D'autre part, ces échanges résultent également de l'existence, à la surface des cellules de la peau, nerveuses ou pas, de récepteurs spécifiques des neuromédiateurs qui, lorsqu'activés par ces derniers, modulent les propriétés des cellules cutanées, aussi bien épidermiques (kératinocytes, mélanocytes, cellules de Langerhans) que dermiques (fibroblastes, cellules endothéliales).

- D'une façon générale, il est maintenant clairement admis une forte implication du système nerveux dans les métabolismes cutanés.
- Toutes les principales fonctions de la peau, telles l'immunité, la défense de l'organisme contre les agressions du milieu extérieur, la différenciation et la prolifération cellulaire, la pigmentation, sont aujourd'hui susceptibles d'être modulées, voire contrôlées, par le système nerveux (L. Misery, International Journal of Cosmetic Science (2002), vol.24, pp.111-116).
- Au niveau de la peau et de son rôle dans le mécanisme immunitaire par exemple, une altération du système nerveux cutané, après l'agression d'un corps étranger localisé, s'accompagne d'une réaction inflammatoire anormale. En effet, les neuropeptides cutanés, sécrétés par les terminaisons nerveuses, participent aux mécanismes de cette réaction inflammatoire en agissant sur les récepteurs membranaires des cellules immunes (lymphocytes, macrophages) et/ou cutanées (kératinocytes, mélanocytes, fibroblastes, cellules de Langerhans) afin de libérer les cytokines, substances nécessaires, selon les types, à l'induction, l'entretien ou la réduction de l'état inflammatoire. Le neuropeptide 'substance P' est ainsi décrit être un activateur de la synthèse de cytokines (IL-1 ou TNF-alpha) (Ansel J.C. et al., Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings (1997), vol.2, pp.23-26).
- Un autre neuropeptide, le CGRP ou 'calcitonin gene-related peptide', est lui plutôt considéré comme un stimulant de la prolifération kératinocytaire (Takahashi K. et al., J. Invest. Dermatol. (1993), vol.101, pp.646-651).
- En conséquence, il est aujourd'hui perçu tout l'intérêt d'intervenir sur les cellules nerveuses dans la biologie cutanée. Les applications potentielles de cette implication sont ainsi nombreuses en cosmétologie. De nouvelles perspectives s'offrent notamment dans le traitement de certaines altérations de la peau, telles la neurodégénérescence cutanée, les phénomènes d'inflammation et d'irritation, les troubles de la desquamation, le vieillissement et la sécheresse cutanée, la cicatrisation, les dermatoses du visage, la sudation excessive, etc... (L. Misery, International Journal of Cosmetic Science (2002), vol.24, pp.111-116 et références citées).

La demanderesse a donc considéré une approche qui vise à agir sur certaines fonctions biologiques de la peau impliquant le système nerveux, mais de manière locale exclusivement, c'est-à-dire sur les seules terminaisons nerveuses de la peau, et non pas, à l'instar de nombreuses applications thérapeutiques, sur le système nerveux central. Il n'est nullement envisagé en outre une action au niveau cérébral accompagnée d'une répercussion cutanée.

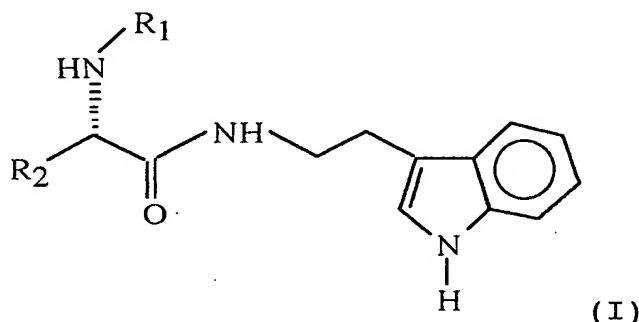
A cet effet, la demanderesse a porté son choix sur l'utilisation d'un type d'actif, acceptable en cosmétique, de structure voisine des substances neurogènes naturelles identifiées pour régir les interactions entre terminaisons nerveuses et cellules cutanées, et capable d'interférer sur ces communications nerveuses cutanées.

Elle a aussi considéré un désordre cosmétique induit par une situation de stress ou de privation de facteur de croissance, exposées et détaillées ci-après dans la description de l'invention.

Ainsi, par analogie avec les neuromédiateurs retrouvés dans la peau, et plus particulièrement les neuropeptides, la demanderesse a retenu une structure de nature peptidique ou proche de celle-ci. Elle a pour cela opté pour un panel d'alpha-aminoacides naturels propres à constituer un neuropeptide. Parmi ce panel, elle a sélectionné un type d'acides aminés à chaîne latérale polaire ou apolaire, au comportement chélateur de métaux et à l'activité antioxydante (Ahmad M. M. et al., JAOCS (1993), vol.80, pp.837-840), (Gopala Krishna A.G. et al., JAOCS (1994), vol.71, pp.645-647), Popov I. et al., Luminescence (1999), vol.14, pp.169-174), en raison de la nature oxydative des nombreux stress responsables des altérations cutanées et des résultats obtenus par la demanderesse avec certains acides aminés de cette sélection dans la mise en évidence des propriétés neuro-cosmétiques.

Enfin, afin de cibler l'actif vers la cellule nerveuse, la demanderesse a également sélectionné la présence d'un motif indolique puisqu'il existe, à la surface des cellules nerveuses, des récepteurs membranaires dont l'affinité pour ce type de motif moléculaire est aujourd'hui connue.

L'objet de l'invention est par conséquent une famille de pseudodipeptides résultant du couplage entre la tryptamine, amine primaire possédant un noyau indole, et une sélection d'alpha-aminoacides, lesdits pseudodipeptides étant représentés par la formule générale (I) suivante :



dans laquelle :

R<sub>1</sub> représente un atome d'hydrogène, un radical acyle ou acyloxy,

R<sub>2</sub> représente la chaîne latérale d'un alpha-aminoacide choisi parmi l'acide L-glutamique, la L-arginine, la L-cystéine, la L-méthionine, la L-histidine, le L-tryptophane, la L-tyrosine.

Il est à noter que lorsque R<sub>1</sub> représente un radical acyle ou acyloxy, substituants biodégradables pouvant être hydrolysés *in vivo*, les dérivés correspondants constituent des formes précurseurs des pseudodipeptides ciblés, au caractère lipophile propre à favoriser leur pénétration cutanée, et donc à améliorer leur biodisponibilité après application topique dudit pseudodipeptide.

De manière avantageuse, on citera les pseudodipeptides alpha-L-glutamyltryptamine, L-méthionyltryptamine et L-tryptophantryptamine, l'exemple préféré étant l'alpha-L-glutamyltryptamine.

Dans le cas du pseudodipeptide alpha-L-glutamyltryptamine, l'invention concerne également un analogue, doué des mêmes propriétés que de dernier, et résultant de la conversion du radical glutamique en radical pyroglutamique selon une cyclisation

intramoléculaire bien connue de l'état de la technique (Burstein Y. et al., Proc. Natl. Acad Sci. USA (1976), vol.73, pp.2604-2608) et de l'homme du métier.

5 Une autre réalisation préférée de l'invention est le pseudodipeptide de formule générale (I) dans lequel R<sub>1</sub> représente un radical acétyle ou ter-butyloxy-carbonyle, et R<sub>2</sub> représente la chaîne latérale d'un alpha-aminoacide choisi parmi l'acide L-glutamique, la L-méthionine, le L-tryptophane.

10

A ce jour, et à la connaissance de la demanderesse, les structures visées par celle-ci sont nouvelles puisque nullement divulguées. L'état antérieur de la technique révèle certes des structures voisines, mais jamais aux fins susmentionnées et selon l'approche  
15 considérée.

La littérature divulgue en effet un certain nombre de dérivés aminoacyl d'une amine dite "biogène", car synthétisée dans l'organisme, à caractère indolique : la sérotonine ou 5-  
20 hydroxytryptamine. Cette amine primaire provenant de l'hydroxylation et de la décarboxylation de l'acide aminé essentiel tryptophane est à la fois un médiateur chimique dans le système nerveux central et une neurohormone déversée dans les voies sanguines et urinaires (Vigy M., Conc. Méd. (1969), vol.14, pp.2865-2868). Elle intervient dans de nombreux domaines (Hindle A.T., Br. J. Anaesth. (1994), vol.73, pp.395-407) et notamment  
25 dans le mécanisme de divers troubles psychiatriques (dépression, schizophrénie, anxiété, etc) ainsi que dans certaines pathologies neurologiques comme la maladie d'Alzheimer ou la migraine.

30

Dans le but de réduire la neurotoxicité accompagnant son utilisation pharmacologique mais aussi la multiplicité de ses effets, des résidus aminoacides ont été conjugués à la sérotonine ou à son analogue méthoxylé. Il est ainsi décrit les synthèses des  
35 L-Gly-5-hydroxytryptamine, beta-L-Ala-5-hydroxytryptamine, gamma-L-aminobutyryl-5-hydroxytryptamine, L-Met-5-hydroxytryptamine, alpha-L-Glu-5-hydroxytryptamine, L-Cyst-5-hydroxytryptamine (Suvorov N.N. et al., Bioorg. Khim. (1976), vol.2, pp.729-736), des L-Gly-5-methoxytryptamine, alpha-L-Ala-5-methoxytryptamine,  
40 beta-L-Ala-5-methoxytryptamine, gamma-L-Glu-5-methoxytryptamine,



L-Arg-5-methoxytryptamine, L-Val-5-methoxytryptamine, L-Meth-5-methoxytryptamine, L-Trp-5-methoxytryptamine, L-Cyst-5-methoxytryptamine (Popova G. V. et al., Tr. Mosk. Khim. Tekhnol. Inst. im D I Mendeleeva (1977), vol.94, pp.84-98), la synthèse du  
 5 alpha-L-Glu-5-methoxytryptamine (Popova G.V. et al., Zh. Obshch. Khim. (1979), vol.49, pp.1418-1424). Dans les composés ci-dessus, et également par la suite, les résidus aminoacides impliqués dans la liaison avec l'amine primaire sont représentés par leur code à trois lettres, selon la nomenclature ci-après :

10

Gly	glycine
Ala	alanine
Met	méthionine
Glu	acide glutamique
15 Arg	arginine
Val	valine
Trp	tryptophane
Cyst	cystéine

20 Le brevet SU 296409 concerne la préparation de dérivés peptidiques de la sérotonine et de la 5-methoxytryptamine. Le document rapporte des propriétés radioprotectrices pour toutes ces structures.

25 Avec l'alpha-méthyltryptamine, un autre analogue de la sérotonine est lui aussi connu de longue date. Médicalement étudié en tant qu'antidépresseur potentiel (Mashkovskii M.D. et al., Psikhiatr. (1963), n°1, pp.72), il a même été commercialisé dans les années  
 30 soixante en Union Soviétique sous le nom d'Indopan® et revendiquait, outre une activité antidépressive, une action stimulante sur le système nerveux central avec notamment une stimulation de l'activité motrice et de l'excitabilité des réflexes. Mais toujours dans l'optique de moduler les propriétés indésirables de l'alpha-méthyltryptamine, il a été introduit par  
 35 la suite un résidu aminoacide sur la chaîne latérale de l'amine, notamment l'acide glutamique (Vigdorchik M.M. et al., Pharm. Chem. J. (1977), vol.11, pp.305-309), les propriétés pharmacologiques du alpha-L-glutamyl-DL-alpha-méthyltryptamine résultant étant alors comparées avec l'Indopan®.

40

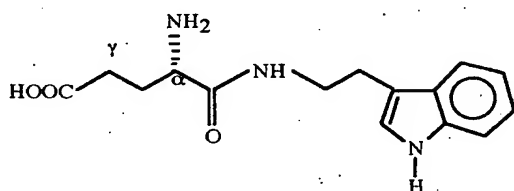
L'homologue glutamique alpha-éthylé fut également synthétisé (Bulatova N.N. et al., Khim. Farm. Zh. (1968), vol.2, pp.6-9), et son action sur le système nerveux central comparée à celle du alpha-L-glutamyl-DL-alpha-methyltryptamine.

5

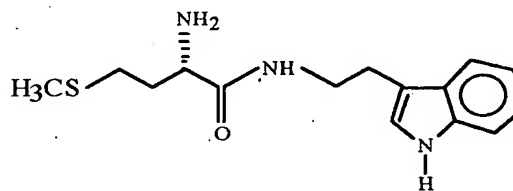
La demanderesse ne se place nullement dans ce contexte de l'art antérieur, à savoir une action directe sur le système nerveux central, ni dans celui d'une amélioration, par une tolérance accrue et un effet plus important dans le temps, des propriétés pharmacologiques des indoleamines sérotonine ou alpha-méthyltryptamine. Dans une toute autre approche, la demanderesse a envisagé la synthèse d'une substance active capable, au regard de son analogie structurale avec les neuromédiateurs cutanés, de marquer une affinité pour les récepteurs des cellules nerveuses et cutanées afin d'induire certaines propriétés neuro-cosmétiques, exposées ci-après avec la présentation des tests.

Dans l'état de la technique, il est également à noter l'identification de glutamylamines, dont la glutamyltryptamine, chez le mollusque marin *Aplysia californica*. Dans tous les cas, il n'a été isolé puis chimiquement reproduit que des dérivés glutamiques conjugués en position gamma avec les amines tryptamine, hydroxytryptamine, dopamine, octopamine, tyramine et phenylethylamine (Mc Caman M.W. et al., J. Neurochem. (1985), vol.45, 1828-1835), l'étape de gamma-glutamylation desdites amines étant supposée inactiver ces dernières.

Parmi les produits répondant à la formule générale (I), les exemples ci-après constituent une liste non limitative des pseudodipeptides selon l'invention :

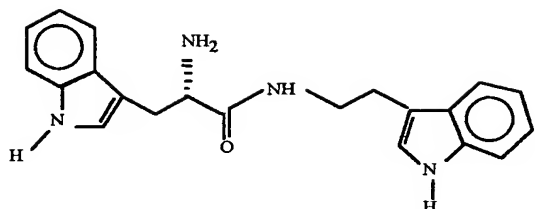


alpha-L-glutamyltryptamine  
(alpha-L-Glu-Tryp)

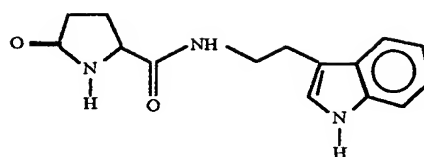


L-methionyltryptamine  
(L-Met-Tryp)

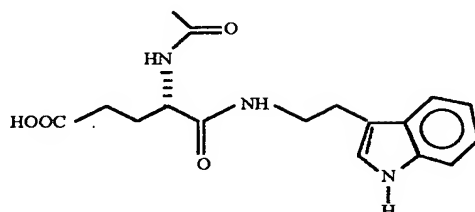
35



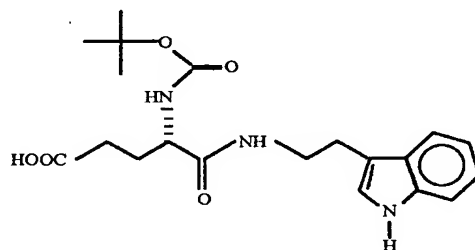
L-tryptophantryptamine  
(L-Trp-Tryp)



L-pyroglutamyltryptamine  
(L-pGlu-Tryp)



N-acetyl-alpha-L-glutamyltryptamine  
(N-Ac-alpha-L-Glu-Tryp)



N-ter-butyloxycarbonyl-alpha-L-glutamyltryptamine  
(N-Boc-alpha-L-Glu-Tryp)

La présente invention concerne en outre un procédé chimique mis au point pour la préparation des pseudodipeptides objets de l'invention. Il comporte successivement les étapes suivantes :

La première étape consiste à protéger la fonction alpha-amino du L-aminoacide par un radical acyle ou acyloxy, préférentiellement par les radicaux acétyle ou ter-butyloxycarbonyle.

Dans le cas de l'acide glutamique, l'étape de protection de la fonction alpha-amino est suivie immédiatement d'une étape d'estérification de la fonction gamma-carboxylique par un radical alkyle, préférentiellement par le radical ter-butyle.

● La seconde étape du procédé consiste à coupler le L-aminoacide N-protégé et, dans le cas de l'acide-L-glutamique, gamma-O-estérifié, à la tryptamine. Ce couplage s'effectue soit directement à l'aide d'un agent de couplage classique, 5 préférentiellement le N, N'-dicyclohexylcarbodiimide, soit via l'activation préalable ou *in situ* de la fonction alpha-carboxylique de l'aminoacide N-protégé par action d'un activateur classique, préférentiellement l'hydroxybenzotriazole, l'expression "classique" signifiant un agent bien connu de l'homme de l'art.

10

Dans une troisième étape, facultative selon le pseudodipeptide recherché, le groupement N-protecteur du pseudodipeptide résultant de l'étape susmentionnée est éliminé, avantageusement par acidolyse et préférentiellement à l'aide d'une solution aqueuse 15 d'acide chlorhydrique.

L'invention a aussi pour objet des compositions neuro-cosmétiques contenant, à titre de principe actif, un pseudodipeptide de formule générale (I) en association avec un ou plusieurs 20 excipients cosmétiquement appropriés.

Un dernier objet de l'invention vise l'utilisation neuro-cosmétique des pseudodipeptides selon l'invention. Celle-ci découle des propriétés présentées ci-après mettant en évidence la 25 capacité desdits pseudodipeptides à interagir sur des cellules nerveuses cutanées.

La demanderesse a ainsi démontré l'utilisation des pseudodipeptides selon l'invention successivement comme agent 30 neuro-cosmétique présentant un effet cytoprotecteur, autrement désigné neuroprotecteur, vis-à-vis de cellules nerveuses cutanées soumises à un rayonnement ultra-violet, comme agent neuro-cosmétique destiné à ralentir le processus de neurodégénérescence, comme agent neuro-cosmétique destiné à lutter contre 35 l'inflammation neurogène, et comme agent neuro-cosmétique capable de stimuler les cellules immunes cutanées.

Le modèle cellulaire choisi par la demanderesse dans toutes ses expérimentations *in vitro* a été une lignée cellulaire pheochromocytomale d'origine murine, appelée "PC 12", communément acceptée pour des études neurobiologiques et neurochimiques sur

cellules nerveuses (Greene L.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1976), vol.73, pp.2424-2428), et en particulier sur les neurones périphériques qui innervent la peau (Keilbaugh S.A., Biochem. Pharm. (1997), vol.53, pp.1485-1492).

La lignée PC 12 est utilisée après différenciation, selon une procédure de la littérature (Greene L.A. et al. in 'Culturing Nerve Cells' (1991), MIT Press, Cambridge, MA, pp.207-225).

Les tests suivants illustrent les propriétés ou effets susmentionnés.

Test 1 : effet cytoprotecteur de l'alpha-L-glutamyltryptamine, du L-methionyltryptamine et du L-tryptophantryptamine vis à vis de PC 12 soumises à un stress UV-B. Comparaison avec un anti-oxydant de référence.

Un stress UV-B cytotoxique est appliqué sur le modèle de cellules nerveuses (285 nm  $\pm$  5; 500 mJ/cm<sup>2</sup>), en absence puis en présence d'actif, successivement les alpha-L-glutamyltryptamine (Glu-Tryp), L-methionyltryptamine (Met-Tryp) et L-tryptophantryptamine (Trp-Tryp).

La mort cellulaire est ensuite évaluée par la mesure de l'activité lactico-deshydrogénase (LDH) dans le milieu de culture. Cette activité est proportionnelle à la lyse cellulaire qui suit la mort cellulaire.

Les résultats sont exprimés en % de protection donné par le rapport des activités LDH, selon l'équation suivante :

$$\% \text{ protection} = \frac{\text{LDH}_{\text{cellules traitées}} - \text{LDH}_{\text{cellules témoins non traitées}}}{\text{LDH}_{\text{cellules témoins non traitées}}} \times 100$$

Les résultats sont comparés à ceux obtenus avec un anti-oxydant de référence, la vitamine E (Vit.E).

La validité du test est vérifiée par la mesure de l'activité LDH dans le milieu de culture de cellules non stressées (contrôle négatif). Les valeurs figurant dans les tableaux ci-après sont des valeurs moyennes obtenues à partir de 6 mesures.

5

# RESULTATS :

	Glu-Trypt (1,72 mM)	Glu-Trypt (0,86 mM)	Glu-Trypt (0,43 mM)	Glu-Trypt (0,1 mM)	Glu-Trypt (0,05 mM)	VitE (2 mM)
% de protection	69	61	48	39	26	34

	Met-Trypt (1,91 mM)	Met-Trypt (0,85 mM)	Met-Trypt (0,48 mM)	Met-Trypt (0,1 mM)	Met-Trypt (0,05 mM)	VitE (2 mM)
% de protection	65	53	42	32	20	34

	Trp-Trypt (1,80 mM)	Trp-Trypt (0,85 mM)	Trp-Trypt (0,45 mM)	Trp-Trypt (0,1 mM)	Trp-Trypt (0,05 mM)	VitE (2 mM)
% de protection	66	58	45	35	22	34

10

Test 2 : Effet anti-âge de l'alpha-L-glutamyltryptamine, du L-methionyltryptamine et du L-tryptophantryptamine avec le ralentissement du processus de neurodégénérescence de PC 12  
15 soumises à une privation de sérum

Une privation de sérum est appliquée aux PC 12 afin de reproduire les effets du vieillissement. Le processus de neurodégénérescence est suivi, en absence puis en présence d'actif, successivement les  
20 alpha-L-glutamyltryptamine (Glu-Tryp), L-methionyltryptamine (Met-Tryp) et L-tryptophantryptamine (Trp-Tryp), par une mesure cinétique de la libération dans le milieu de culture de l'enzyme lactico-deshydrogénase (LDH).

25 Les résultats sont exprimés en taux de survie relatif, donné par le rapport des activités LDH, selon l'équation suivante :

LDH<sub>cellules vieilles traitées</sub> - LDH<sub>cellules témoins non traitées</sub>

% taux = ----- \* 100  
de survie LDH<sub>cellules témoins non traitées</sub>

5

Les valeurs figurant dans les tableaux ci-après sont des valeurs moyennes obtenues à partir de 6 mesures, après une privation de sérum de 9 jours

## 10 RESULTATS :

	Glu-Trypt (0,86 mM)	Glu-Trypt (0,43 mM)	Glu-Trypt (0,1 mM)
amélioration du temps de survie (%)	+33	+19	+19

	Met-Trypt (0,85 mM)	Met-Trypt (0,48 mM)	Met-Trypt (0,1 mM)
amélioration du temps de survie (%)	+28	+15	+12

	Trp-Trypt (0,85 mM)	Trp-Trypt (0,45 mM)	Trp-Trypt (0,1 mM)
amélioration du temps de survie (%)	+30	+20	+17

15

Test 3 : effet anti-inflammatoire de l'alpha-L-glutamyltryptamine, du L-methionyltryptamine et du L-tryptophantryptamine vis à vis de PC 12 soumises à un stress pro-inflammatoire. Comparaison avec deux témoins (PC 12), à savoir l'un non stressé, et l'autre stressé mais non traité.

20

Un stress UV-B pro-inflammatoire est appliqué sur les PC 12 (285 nm  $\pm$  5; 150 mJ/cm<sup>2</sup>), en absence puis en présence d'actif, successivement les alpha-L-glutamyltryptamine (Glu-Tryp), L-methionyltryptamine (Met-Tryp) et L-tryptophantryptamine (Trp-Tryp).

25

La réponse inflammatoire neurogène est évaluée par la mesure du taux d'interleukine-6 pro-inflammatoire (IL-6) produite par les PC 12.

## 5 RESULTATS

	témoin non irradié	Glu-Trypt (0,86 mM)	Glu-Trypt (0,43 mM)	Glu-Trypt (0,1 mM)	témoin irradié non traité
taux d'IL-6 produite (pg/ml)	0	70	180	240	400

	témoin non irradié	Met-Trypt (0,85 mM)	Met-Trypt (0,48 mM)	Met-Trypt (0,1 mM)	témoin irradié non traité
taux d'IL-6 produite (pg/ml)	0	85	210	290	400

	témoin non irradié	Trp-Trypt (0,85 mM)	Trp-Trypt (0,45 mM)	Trp-Trypt (0,1 mM)	témoin irradié non traité
taux d'IL-6 produite (pg/ml)	0	100	210	305	400

10

Test 4 : Stimulation du système neuro immuno-cutané par l'alpha-L-glutamyltryptamine, le L-methionyltryptamine ou le L-tryptophantryptamine. Comparaison avec deux témoins.

15 Les PC 12, différenciées selon un processus particulier pour éviter des artéfacts, c'est à dire après une brève privation en facteurs de croissance et de différenciation, sont mises en présence de concentrations variables de pseudodipeptides, successivement les alpha-L-glutamyltryptamine (Glu-Tryp), L-methionyltryptamine (Met-Tryp) et L-tryptophantryptamine (Trp-Tryp).

20



Après 5 jours d'incubation, les surnageants cellulaires, contenant les neuromédiateurs et autres sécrétions, sont prélevés puis introduits dans une culture de cellules monocytes immunes, la lignée THP-1.

5

L'effet sur le système neuro immuno-cutané est observé par la mesure du taux d'interleukine IL-1 $\beta$  produite par les monocytes, en réponse à l'addition des surnageants issus de la culture de PC 12.

- 10 Les résultats sont comparés à deux témoins, en l'occurrence l'un comprenant les cellules immunes sans surnageant, et l'autre comprenant les cellules immunes avec surnageant mais non traitées.

# RESULTATS

15

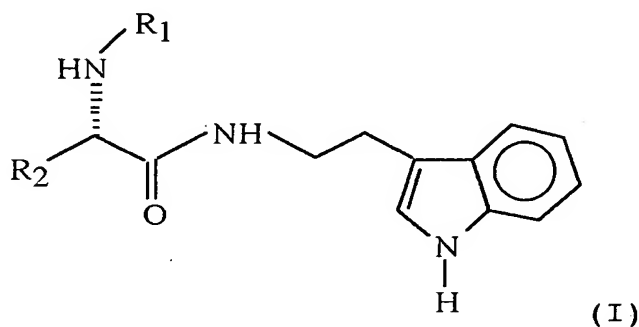
	THP-1 sans surnag.	THP-1 + surnag. + Glu-Tryp (0,43 mM)	THP-1 + surnag. + Glu-Tryp (0,1 mM)	THP-1 + surnag. + Glu-Tryp (0,05 mM)	témoin irradié non traité
taux d'IL-1 $\beta$ produite (pg/ml)	0	90	63	45	40

	THP-1 sans surnag.	THP-1 + surnag. + Met-Tryp (0,48 mM)	THP-1 + surnag. + Met-Tryp (0,1 mM)	THP-1 + surnag. + Met-Tryp (0,05 mM)	témoin irradié non traité
taux d'IL-1 $\beta$ produite (pg/ml)	0	85	55	42	40

	THP-1 sans surnag.	THP-1 + surnag. + Trp-Tryp (0,45 mM)	THP-1 + surnag. + Trp-Tryp (0,1 mM)	THP-1 + surnag. + Trp-Tryp (0,05 mM)	témoin irradié non traité
taux d'IL-1 $\beta$ produite (pg/ml)	0	92	60	44	40

## REVENDICATIONS

1. Pseudodipeptide caractérisé en ce qu'il est représenté par la  
5 formule générale (I) suivante :



dans laquelle :

10 R<sub>1</sub> représente un atome d'hydrogène, un radical acyle ou  
acyloxy,  
R<sub>2</sub> représente la chaîne latérale d'un alpha-aminoacide  
choisi parmi l'acide L-glutamique, la L-arginine, la L-  
cystéine, la L-méthionine, la L-histidine, le L-tryptophane,  
15 la L-tyrosine.

2. Pseudodipeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce  
qu'il s'agit de l'alpha-L-glutamyltryptamine, du L-  
methionyltryptamine et du L-tryptophantryptamine.

20 3. Pseudodipeptide selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce  
qu'il s'agit de l'alpha-L-glutamyltryptamine.

25 4. Pseudodipeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce que  
R<sub>1</sub> représente un radical acétyle ou ter-butyloxy-carbonyle, R<sub>2</sub>  
représente la chaîne latérale d'un alpha-aminoacide choisi parmi  
l'acide L-glutamique, la L-méthionine, le L-tryptophane.

30 5. Analogue du pseudodipeptide selon la revendication 3 résultant  
de la cyclisation intramoléculaire du radical glutamique en  
radical pyroglutamique.

6. Procédé chimique de préparation du pseudodipeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- a) protection de la fonction alpha-amino du L-aminoacide par un radical acyle ou acyloxy,
- b) couplage du L-aminoacide N-protégé avec la tryptamine
- c) élimination ou non du groupement N-protecteur selon le pseudodipeptide recherché.

7. Procédé selon la revendication 6 dans lequel le L-aminoacide est l'acide glutamique et dans lequel l'étape a) est suivie, préalablement à l'étape b), d'une étape d'estérification de la fonction gamma-carboxylique par un radical alkyle.

8. Procédé selon la revendication 6 dans lequel les groupements N-protecteurs sont choisis parmi les radicaux acétyle ou ter-butyloxy-carbonyle.

9. Composition neuro-cosmétique caractérisée en ce qu'elle comprend un pseudodipeptide de formule générale (I) tel que défini dans l'une des revendications 1 à 5, en association avec un ou plusieurs excipients cosmétiquement appropriés.

10. Utilisation d'un pseudodipeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 comme agent neuro-cosmétique présentant un effet cytoprotecteur vis-à-vis de cellules nerveuses cutanées soumises à un rayonnement ultra-violet.

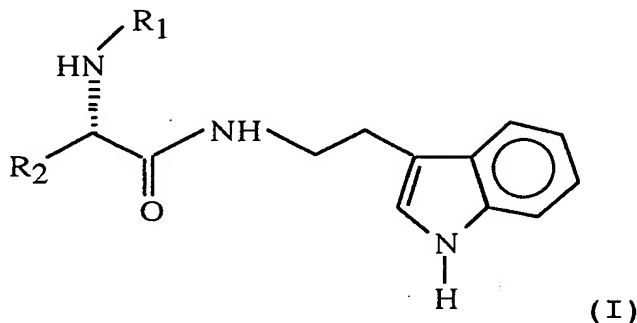
11. Utilisation d'un pseudodipeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 comme agent neuro-cosmétique destiné à ralentir le processus de neurodégénérescence.

12. Utilisation d'un pseudodipeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 comme agent neuro-cosmétique destiné à lutter contre l'inflammation neurogène.

13. Utilisation d'un pseudodipeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 comme agent neuro-cosmétique capable de stimuler les cellules immunes cutanées.

## ABREGE

L'objet de l'invention a pour objet une famille de  
 5 pseudodipeptides, produits de couplage entre la tryptamine, amine  
 primaire de nature indolique, et une sélection d'alpha-  
 aminoacides, lesdits pseudodipeptides étant représentés par la  
 formule générale (I) suivante :



dans laquelle :

R<sub>1</sub> représente un atome d'hydrogène, un radical acyle ou  
 acyloxy,

15 R<sub>2</sub> représente la chaîne latérale d'un alpha-aminoacide  
 choisi parmi l'acide L-glutamique, la L-arginine, la L-  
 cystéine, la L-méthionine, la L-histidine, le L-tryptophane,  
 la L-tyrosine

20 L'invention concerne également le procédé de préparation desdits  
 produits, ainsi que leurs applications dans des compositions  
 neuro-cosmétiques ou en tant que substances actives sur le système  
 nerveux cutané.

*Duplicata, conforme à l'original,*

*J. Valdon*

La présente copie comporte un mémoire descriptif sur **18 feuillets**

rayé nul : **néant**  
ajouté : **néant**  
Dessins annexés : **✓. feuillets**

Pour expédition certifiée conforme aux pièces primitivement déposées le **04/10/2002**  
(**PV n° 2488**) à l'appui de la demande sus-visée.

Corrections de forme ou d'erreurs matérielles après dépôt, sur justifications de l'intéressé :

DATE	PAGE	LIGNE	CORRECTIONS
			NEANT

Monaco, le 14 novembre 2003.

P/Le Directeur,  
L'Adjoint au Directeur

Marie-Pierre

